

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07127

研究課題名(和文) 腸管脂肪吸収における神経ペプチドCGRPの役割と制御機構の解明

研究課題名(英文) The role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in regulation of intestinal fat absorption

研究代表者

細野 加奈子 (Hosono, Kanako)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：80532556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腸管リンパ管(乳糜管)は脂肪吸収という重要な役割を果たしている。本研究は乳糜管を介した脂肪吸収に果たすCGRP/RAMP1の役割とその制御機構を解明するため遂行した。高脂肪食負荷によりRAMP1 KOではWTよりも体重が増加し、肥満症状を呈した。この時RAMP1 KOでは乳糜管構造および脂肪吸収機能に変化を認めており、CGRP/RAMP1の脂肪吸収調節への関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで乳糜管における脂肪吸収のメカニズムは未解明であった。本研究では高脂肪食によって誘導された乳糜管可塑性にはCGRP/RAMP1が関与する可能性を検証するもので、知覚神経由来の神経ペプチドが肥満に関与するかどうかに焦点をあてて解明を進めるのが本研究の特徴である。脂肪吸収、脂肪循環の最初の関門である乳糜管機能にCGRP/RAMP1経路の役割を明らかにすることができれば、肥満・メタボリック症候群の発症への治療介入につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Lacteals, lymphatic vessels at the center of each intestinal villus, play an important role in fat absorption. The present study was examined whether CGRP (Calcitonin gene-related peptide) and its receptor, RAMP1 (receptor activity modifying protein 1), are involved in fat absorption via the lacteals. RAMP1 KO mice fed HFD for 8 weeks gained higher body weights compared with WT mice and developed severe obesity. In HFD fed RAMP1 KO mice, the structures of lacteals and the fat absorption function were compromised, suggesting that CGRP / RAMP1 is involved in the regulation of dietary fat absorption by lacteals.

研究分野：薬理学

キーワード：脂肪吸収 腸管リンパ管 CGRP RAMP1 肥満

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

リンパ管は体液循環の維持や免疫担当細胞の動員などの役割を担っている。これまで我々は、リンパ浮腫(Lab Invest 2011)、創傷治癒(ATVB 2010, PlosOne 2016)、腸炎 (Biomed Pharma 2020)、腹膜炎(ATVB 2021)などにおいて、リンパ管新生が誘導され、これらの病態に寄与することを報告してきた。

一方、リンパ管には腸管からの脂肪吸収という重要な働きがある。食餌中の脂肪は小腸上皮においてカイロミクロンというリポタンパク質となり、絨毛の乳糜管 (リンパ管) から吸収され、リンパ管に流入する。その後、胸管次いで静脈角を經由して血液循環に合流して全身へ運ばれる。最近、リンパ管新生因子を抑制すると乳糜管の発達が抑制され脂肪吸収障害による肥満抑制がおきることが報告された。さらに、乳糜管周囲を取り巻く平滑筋収縮が乳糜管収縮に関与し、脂肪吸収および脂質循環を制御することが示された(図 1)。(JCI 2015)。これまで多くの因子が肥満の原因となることが報告されたが、脂肪吸収の入り口である乳糜管のメカニズム解析が代謝疾患の治療につながる可能性がある。

我々はこれまでに、腸管内刺激によって遊離された CGRP が消化管平滑筋運動を抑制する作用があること (Gut 2003, JGastroHep 2005)、免疫細胞にある CGRP の受容体サブセットである受容体活性調節蛋白 1 (RAMP1: receptor activity modifying protein 1)を介してリンパ管新生を制御することを

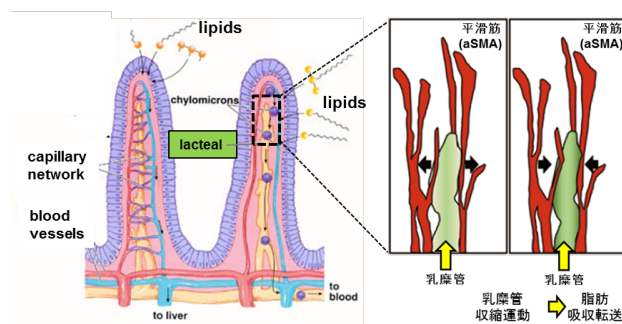


図1.腸管絨毛内乳糜管(lacteal)運動を介した脂肪吸収・転送

みいだした (FasebJ 2014, JSurgRes 2017)。従って、高脂肪食負荷に対して CGRP/RAMP1 が乳糜管周囲平滑筋に作用して乳糜管を収縮させ脂肪循環を制御すること、また免疫細胞 RAMP1 を介して、乳糜管の構造・機能を適応させることが明らかになれば肥満や代謝疾患の治療につながる可能性がある。

以上の背景から CGRP/RAMP1 は乳糜管の可塑性を制御することで脂肪循環障害による肥満やメタボリック症候群と深く関係しているというのではないか、という発想に至った。

### 2. 研究の目的

腸管リンパ管 (乳糜管) は脂肪吸収という重要な役割を果たしている。従って、乳糜管の構造・機能異常は脂質循環障害をきたし肥満や脂質代謝異常などを発症する可能性がある。そこで、本研究では乳糜管を介した脂肪吸収に果たす CGRP/RAMP1 の役割とその制御機構を解明し、腸管リンパ管の可塑性制御が肥満や代謝疾患治療につながるかを明らかにするため検討を行った。すなわち

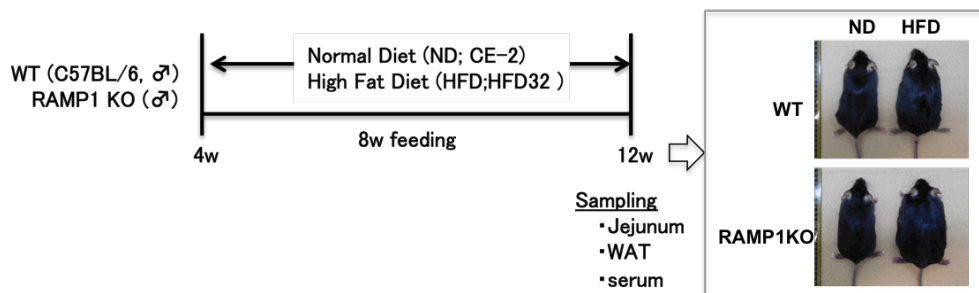
- ① 高脂肪食負荷による肥満発症は腸管リンパ管系(乳糜管)の脂肪吸収と関連しているか。
- ② 腸管リンパ系による脂肪吸収制御機構に神経ペプチド CGRP が重要な役割を果たしているか。

これらを明らかにした成果を踏まえて、肥満や脂質代謝異常の新規治療法開発への基盤研究へとつなげることを期待する。

### 3. 研究の方法

雄性 RAMP1 ノックアウトマウス(RAMP1 KO)と野生型マウス(WT)に高脂肪食(HFD, High Fat Diet)または普通食(ND, Normal Diet)を 4 週齢から 12 週齢までの 8 週間給餌し、経時的に体重変化を測定した。8 週間給餌後、腸管組織、脂肪組織、血液を採取し、内臓脂肪量、血清コレステロール、血清中性脂肪、血糖を測定して比較検討した。

また腸管リンパ管（乳糜管）を評価するため、リンパ管内皮マーカー（LYVE-1, prox-1, VEGFR-3）および既存のリンパ管新生因子（VEGF-C, VEGF-D）の発現を whole mount 免疫染色や real time PCR 法により評価した。加えて、CGRP、RAMP1 発現や乳糜管表面にある Button/Zipper 構造を whole mount 免疫染色を用いて免疫組織学的に評価した。また、蛍光標識された長鎖脂肪酸(BODIPY FL C16)を経口投与し、3 時間後に腸管組織および血清を採取して血中の蛍光脂肪色素強度を測定して乳糜管脂肪吸収機能を評価した。



#### 4. 研究成果

##### (1) 神経ペプチド CGRP の肥満、脂質代謝における役割解明

肥満における CGRP/RAMP1 の役割解明のため、RAMP1 KO、WT に高脂肪食(HFD, High Fat Diet) または普通食(ND, Normal Diet)を 4 週齢から 12 週齢までの 8 週間給餌した。その結果、高脂肪食を摂取した RAMP1 KO では WT に比べ体重が増加した(図 2)。また、内臓脂肪量、血清コレステロール、血清中性脂肪、血糖について比較したところ、いずれも RAMP1 KO では WT に比べ高値となっていた。一方、普通食を摂取した場合は差は認められず、CGRP/RAMP1 の肥満、脂質代謝への関与が考えられた。

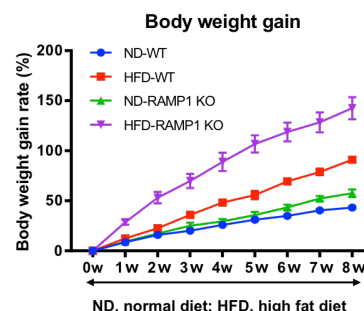


図2. RAMP1 KOに高脂肪食(HFD)を給餌するとWTよりも体重が増加した。

そこで腸管組織を採取し、CGRP、RAMP1 の発現とその発現部位を免疫染色により確認した。その結果、腸管絨毛内では CGRP 陽性神経線維が乳糜管および平滑筋周囲に豊富に分布することを見いだした(図 3)。また、RAMP1 は乳糜管ではなく乳糜管周囲平滑筋やマクロファージに発現していた。

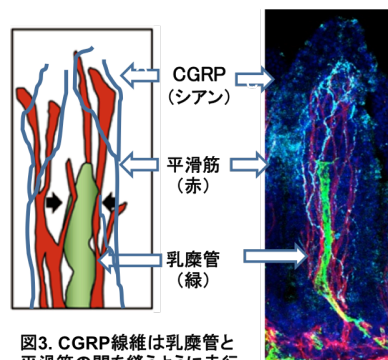


図3. CGRP線維は乳糜管と平滑筋の間を縫うように走行。

##### (2) 腸管乳糜管による脂肪吸収における CGRP/RAMP1 シグナルの役割

乳糜管構造を解析すると、高脂肪食を摂取した RAMP1 KO では WT に比べ乳糜管の長さが短縮する傾向が認められた。さらに、リンパ管形成に重要なリンパ管新生因子である VEGF-C/D やリンパ管マーカーである LYVE-1, VEGFR3 発現の変化を RT-PCR により評価したところ、高脂肪食を摂取した RAMP1 KO ではリンパ管内皮マーカーやリンパ管新生因子の発現が減少していることが分かった。

さらに、蛍光標識した長鎖脂肪酸(BODIPY FL C16)を経口投与し乳糜管脂肪吸収機能を調べたところ、興味深いことに血液中の蛍光脂肪色素強度は高脂肪食を摂取した RAMP1 KO だけがより高く、多くの長鎖脂肪酸を取り込んでいたことから、CGRP/RAMP1 の脂肪吸収調節への関与が示唆された。

### (3) 乳糜管の構造と脂肪吸収機能における RAMP1 の関与

乳糜管による脂肪吸収には乳糜管表面にある Button 構造および Zipper 構造が関与する(図4)。Button 構造は脂肪吸収を促進し、Zipper 構造は抑制する。そこで脂肪負荷時における乳糜管表面構造(Button および Zipper 構造)に変化があるかどうか免疫組織学的な解析を行うため、乳糜管を LYVE-1、Button/Zipper 構造を VE-cadherin で染色し共焦点顕微鏡を用いて免疫組織学的解析を試みた。その結果、乳糜管表面構造(Button/Zipper 構造)は

Button 構造と Zipper 構造が混在しており、これらのバランスにより脂肪吸収を調節していることが推察された。高脂肪食を負荷した RAMP1KO ではより肥満になることから、乳糜管による脂肪吸収が増強される Button 構造優位パターンをなっている可能性が考えられる。

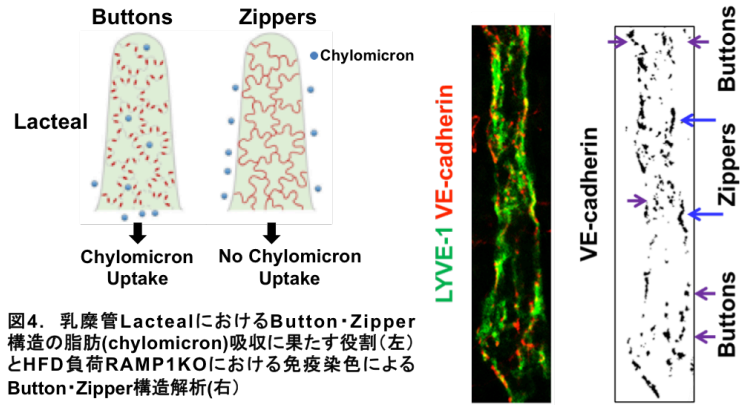


図4. 乳糜管LactealにおけるButton・Zipper構造の脂肪(chylomicron)吸収に果たす役割(左)とHFD負荷RAMP1KOにおける免疫染色によるButton・Zipper構造解析(右)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Matsuda Hiromi, Ito Yoshiya, Hosono Kanako, Tsuru Seri, Inoue Tomoyoshi, Nakamoto Shuji, Kurashige Chie, Hirashima Masanori, Narumiya Shuh, Okamoto Hirotsugu, Majima Masataka	4. 巻 41
2. 論文標題 Roles of Thromboxane Receptor Signaling in Enhancement of Lipopolysaccharide-Induced Lymphangiogenesis and Lymphatic Drainage Function in Diaphragm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 1390 ~ 1407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.120.315507	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Majima Masataka, Hosono Kanako, Ito Yoshiya, Amano Hideki	4. 巻 232
2. 論文標題 Biologically active lipids in the regulation of lymphangiogenesis in disease states	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 108011 ~ 108011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pharmthera.2021.108011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hosono Kanako, Kojo Ken, Narumiya Shuh, Majima Masataka, Ito Yoshiya	4. 巻 128
2. 論文標題 Prostaglandin E receptor EP4 stimulates lymphangiogenesis to promote mucosal healing during DSS-induced colitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 110264 ~ 110264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2020.110264	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hattori Kyoko, Ito Yoshiya, Honda Masako, Sekiguchi Kazuki, Hosono Kanako, Shibuya Masabumi, Unno Nobuya, Majima Masataka	4. 巻 143
2. 論文標題 Lymphangiogenesis induced by vascular endothelial growth factor receptor 1 signaling contributes to the progression of endometriosis in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 255 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2020.05.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Honda Masako, Ito Yoshiya, Hattori Kyoko, Hosono Kanako, Sekiguchi Kazuki, Tsujikawa Kazutake, Unno Nobuya, Majima Masataka	4. 巻 24
2. 論文標題 Inhibition of receptor activity-modifying protein 1 suppresses the development of endometriosis and the formation of blood and lymphatic vessels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 11984 ~ 11997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcmm.15823	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuru Seri, Ito Yoshiya, Matsuda Hiromi, Hosono Kanako, Inoue Tomoyoshi, Nakamoto Shuji, Kurashige Chie, Mishima Toshiaki, Tsujikawa Kazutake, Okamoto Hirotsugu, Majima Masataka	4. 巻 -
2. 論文標題 RAMP1 signaling in immune cells regulates inflammation-associated lymphangiogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0364-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 伊藤 義也、細野 加奈子、後藤 卓也、田邊 美奈、山下 敦、長田 真由子、畑中 公、馬嶋 正隆、天野 英樹
2. 発表標題 RAMP1シグナルの脂肪肝内炎症抑制効果
3. 学会等名 第145回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本田 雅子、伊藤 義也、服部 響子、細野加奈子、中本 修司、大高 史聖、津留 世里、馬嶋 正隆
2. 発表標題 マウス子宮内膜症におけるRAMP1の血管・リンパ管新生促進作用
3. 学会等名 第41回炎症再生医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細野 加奈子、伊藤 義也、天野 英樹、馬嶋 正隆
2. 発表標題 Neuropeptide CGRP regulates inflammation by increasing lymphangiogenesis
3. 学会等名 第93回日本薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津留 世里、伊藤 義也、松田 弘美、細野 加奈子、岡本 浩嗣、馬嶋 正隆
2. 発表標題 TP signaling in immune cells promotes lymphangiogenesis in the diaphragm during peritonitis
3. 学会等名 第93回日本薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本田 雅子、伊藤 義也、服部 響子、細野 加奈子、中本 修司、大高 史聖、津留 世里、馬嶋 正隆
2. 発表標題 RAMP1 signaling facilitates angiogenesis and lymphangiogenesis in the endometriotic lesions in mice
3. 学会等名 第93回日本薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤義也、津留世里、細野加奈子、天野英樹、馬嶋正隆
2. 発表標題 リンパ管新生を制御する神経ペプチドCGRPの役割
3. 学会等名 第43回日本リンパ学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津留世里、伊藤義也、細野加奈子、井上智仁、松田弘美、藏重千絵、中本修司、大高史聖、岡本浩嗣、馬嶋正隆
2. 発表標題 腹膜炎時の横隔膜リンパ管新生を制御する受容体活性調節蛋白 1 (RAMP1)の役割
3. 学会等名 第40回日本炎症再生医学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊藤 義也  (Ito Yoshiya)  (40203187)	北里大学・医学部・准教授    (32607)	モデル作成、生体イメージング

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------